Cours de
Cytologie & Physiologie cellulaire

Dr A. DEKAR - MADOUI

Promo: 2014-2015

Chapitre II

Méthodes d'étude de la cellule



Introduction

Le microscope photonique à fond clair (M. Ph. ou M.O.)

- Description
- Fonctionnement
- Technique histologique

Le microscope photonique à fluorescence

- Principe de fonctionnement
- Technique de détection et localisation des composés cellulaires

Le microscope électronique à transmission MET

- Fonctionnement
- Technique des coupes minces et coloration positive
- Technique d'autoradiographie

Plan (suite)

Le microscope électronique à balayage MEB

- Fonctionnement
- Technique de cryofracture / cryodécapage + Ombrage

Le fractionnement & isolement subcellulaire

- Technique d'UCD et UGD
- Technique de coloration négative



Introduction

Le microscope photonique à fond clair M. Ph. / M.O.

- Description
- Fonctionnement

- Technique histologique

- Le microscope photonique à fluorescence

Le microscope photonique à fluorescence

- Principe de fonctionnement
- Technique de détection et localisation des composés cellulaires

Le microscope électronique à transmission MET

- Fonctionnement
- Technique des coupes minces et coloration positive

- Technique d'autoradiographie

Objectif 1

Définir la notion de pouvoir séparateur

Notion de pouvoir séparateur = pouvoir de résolution

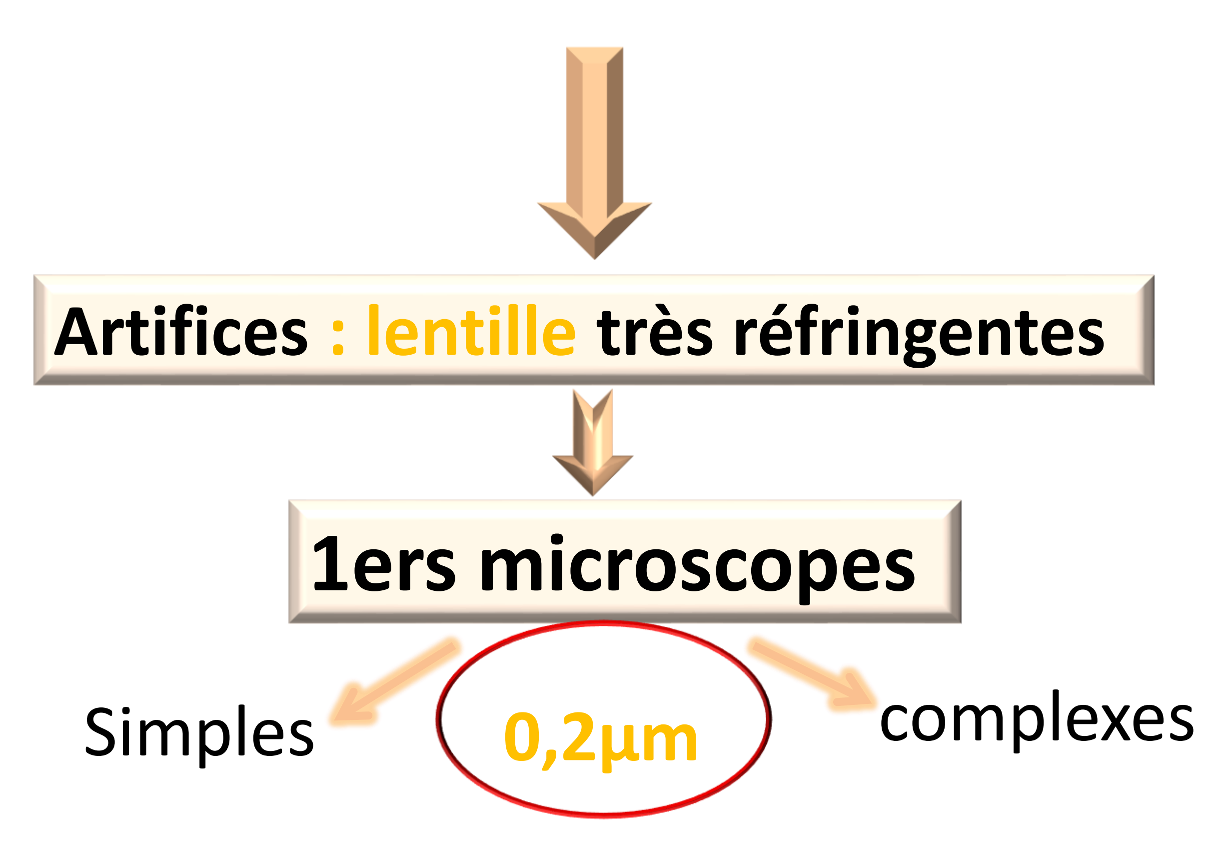
- ✓ Capacité de l'œil à distinguer clairement deux points très rapprochés → **0,2mm**

- ✓ Organismes de taille plus petite → Invisibles pour l'oeil



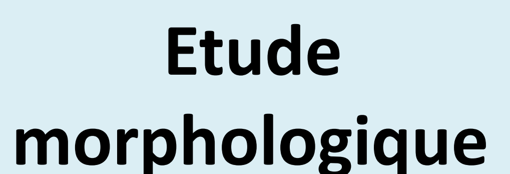
instrument d'optique permettant d'examiner ces organismes et leurs détails

les instruments d'optique ont été conçus selon le modèle de l'œil:
La lumière traverse des milieux réfringents



Connaissance de la cellule





Etude morphologique



- Description structurale& ultrastructurale
- Taille
- Forme
- Contenu

Etudes morpho-chimique



- Détection
- Localisation
- Quantification

} Composants

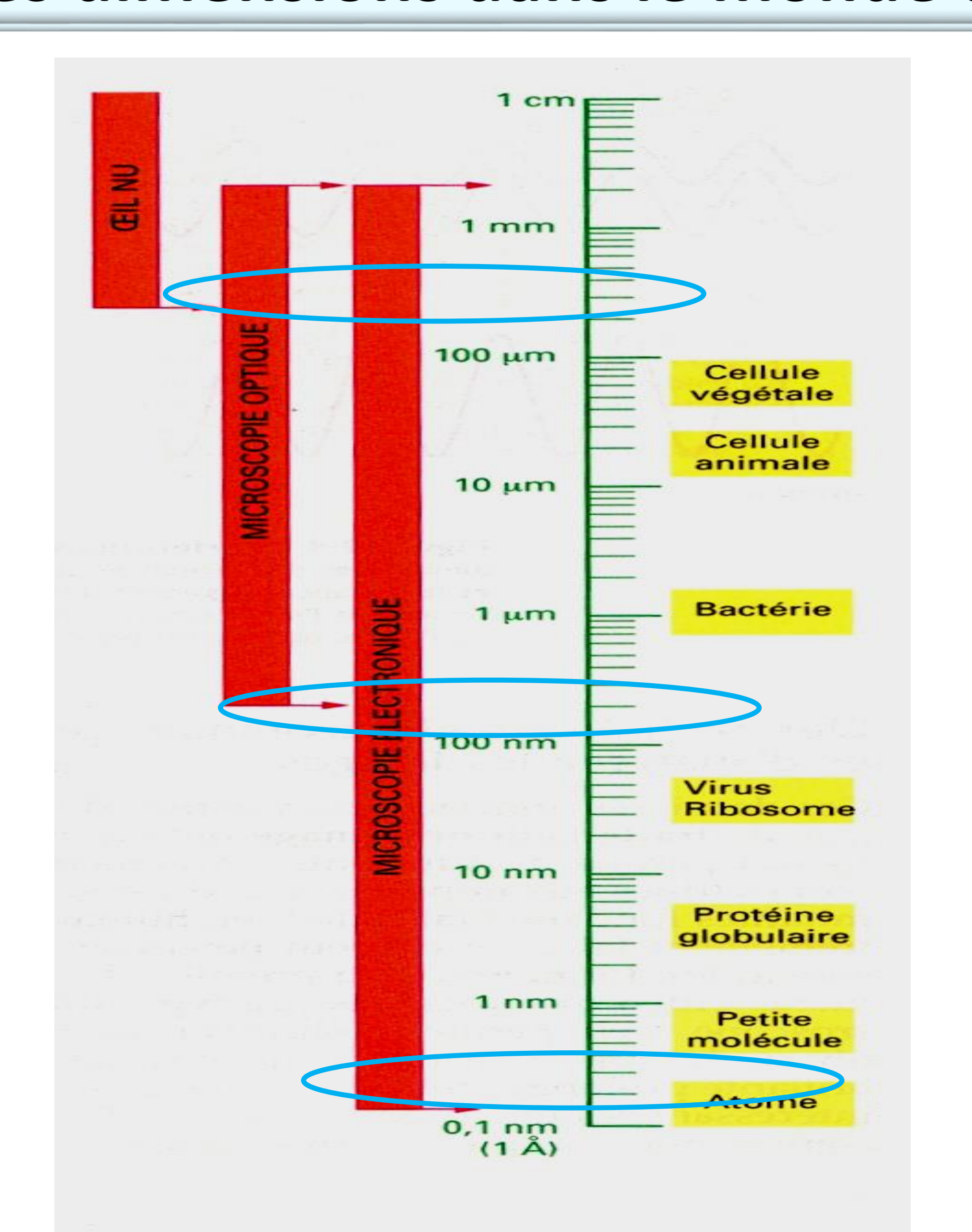
Etude moléculaire



- Nature des molécules
- Organisation

De la lentille au microscope

Echelle des dimensions dans le monde du vivant



Les premiers microscopes optiques



Microscope de Cuff (1760)



Microscope optique (1751)

Les premiers microscopes optiques





Modèle Voigt & Hochgesang"
(1890)

Microscope Carl Zeiss 1891

Composants du microscope photonique

mise au point
grossière et fine

oculaire

objectifs

platine porte-échantillon
(avec pinces)

diaphragme

miroir

Oculaire

Objectifs

Potence

Tourelle

Valets

Platine

Lampe

Condenseur et
diaphragme

Macrovis

Interrupteur

Microvis

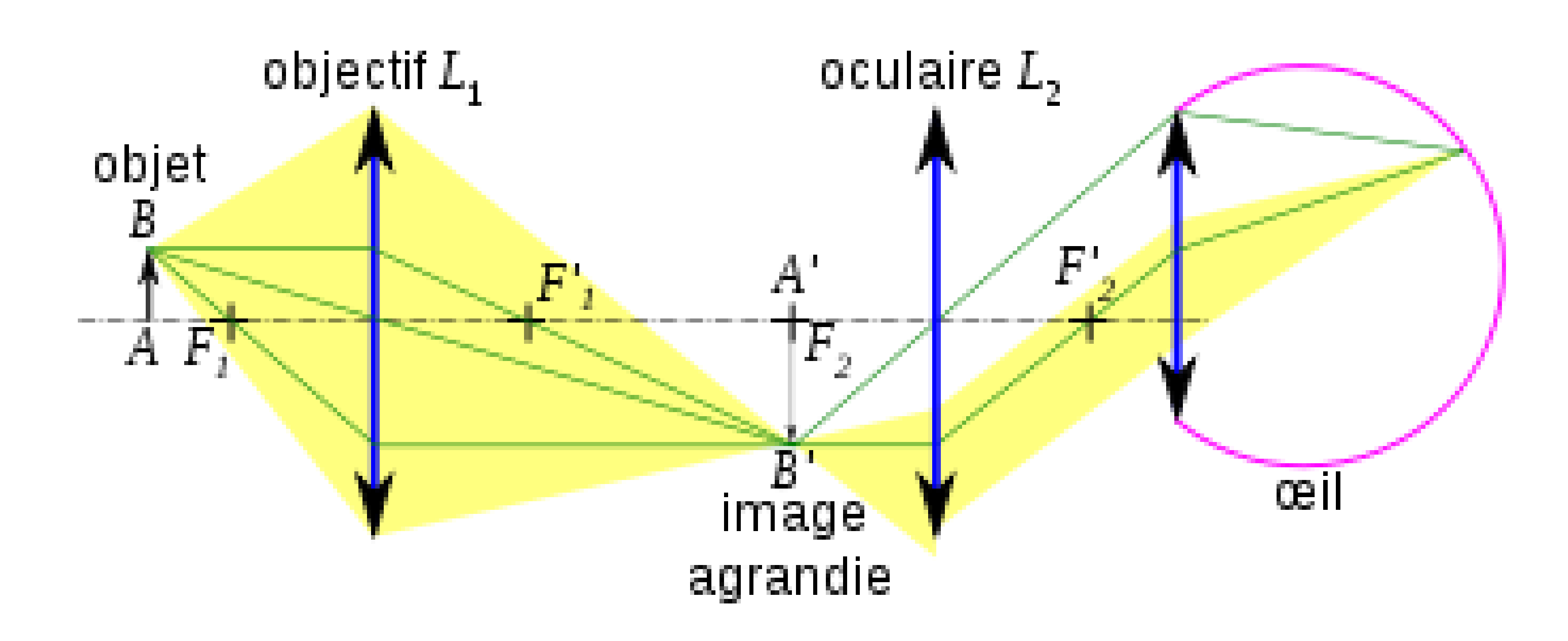
Pied

Objectif 2

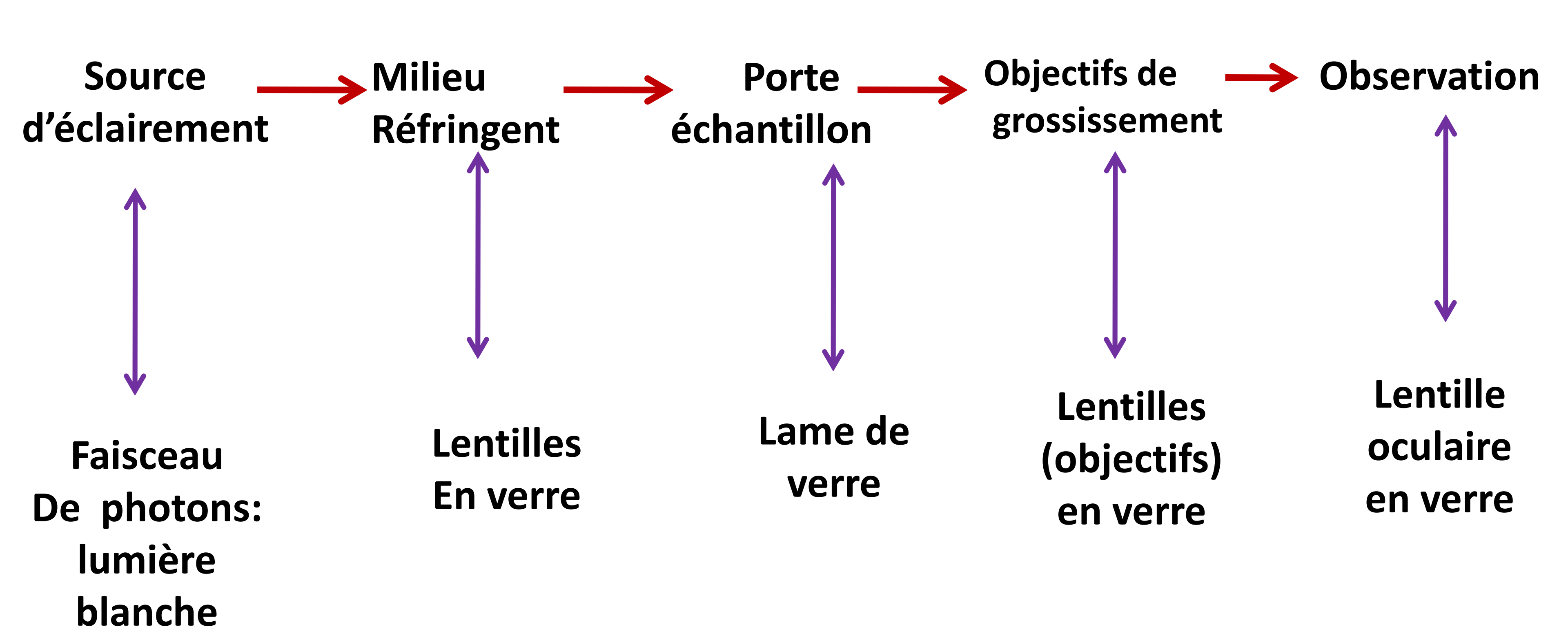
connaître le principe de fonctionnement des microscopes photoniques

Principe de la transmission du faisceau de photons

Les microscopes sont conçus selon le principe de l'optique. la formation de l'image dans la rétine de l'œil se fait par la transmission du faisceau de photons à travers les milieux liquidiens de l'œil

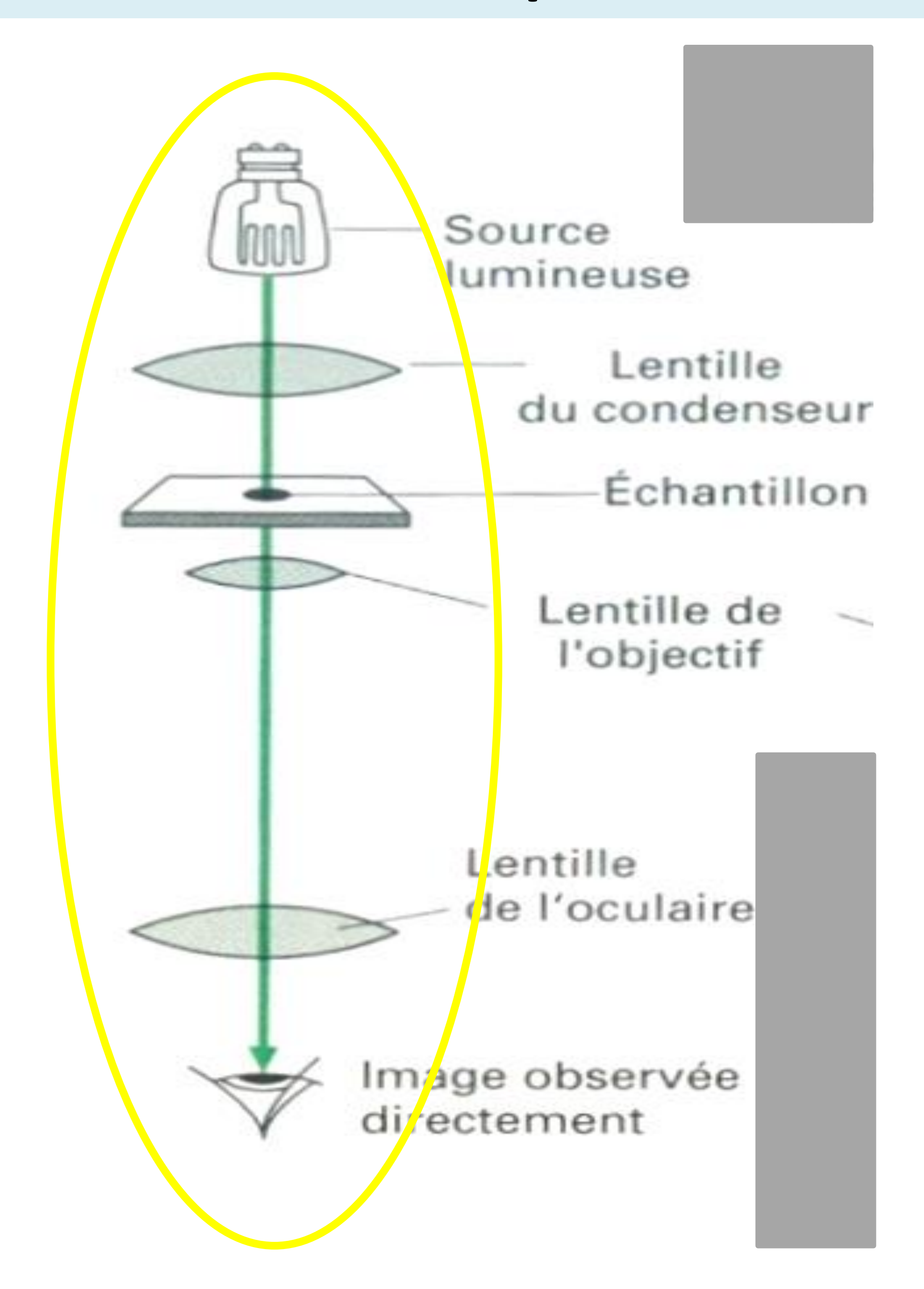


Principe de fonctionnement du M. Ph



Résultat : image en couleur

Principe de la transmission pour le M Ph. Et le ME



Objectifs 3

Connaître le principe de chaque mode préparatoire des échantillons en vue de leur analyse aux différents microscopes

Méthodes de préparation de l’échantillon Pour l’observation au M Ph.

Technique histologique

Prélèvement

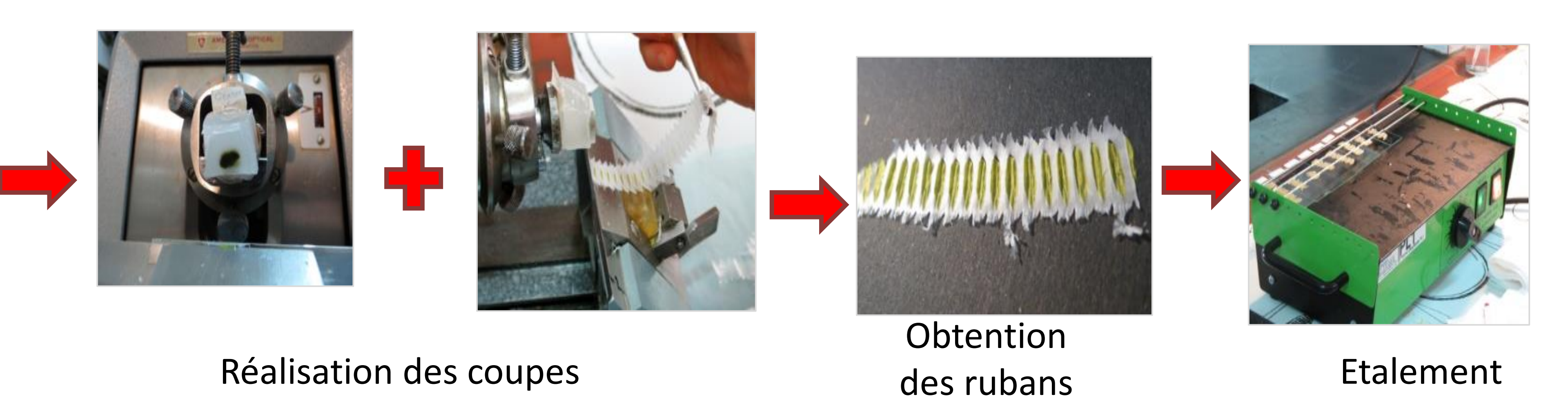
Dissection et prélèvement

Fixation

4 jrs

Déshydratation

Inclusion

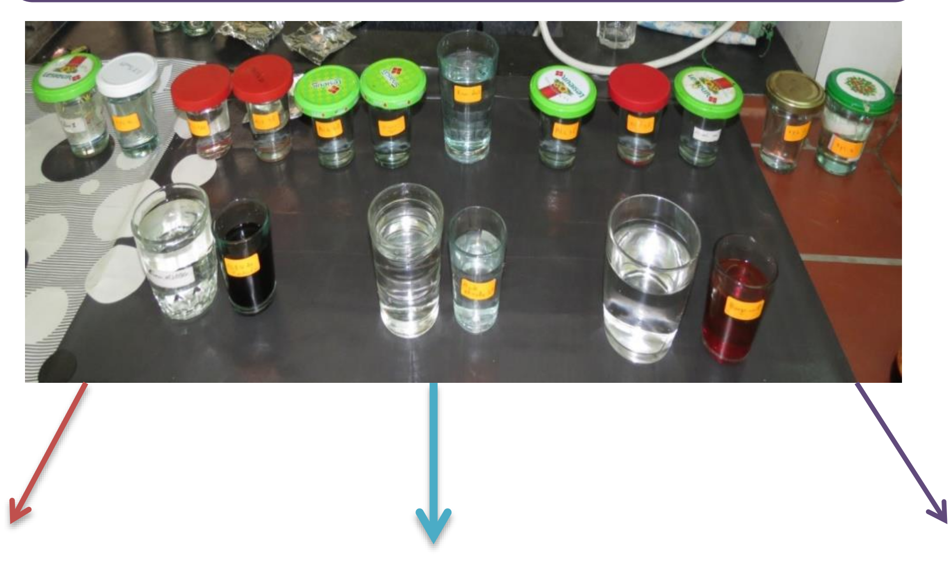


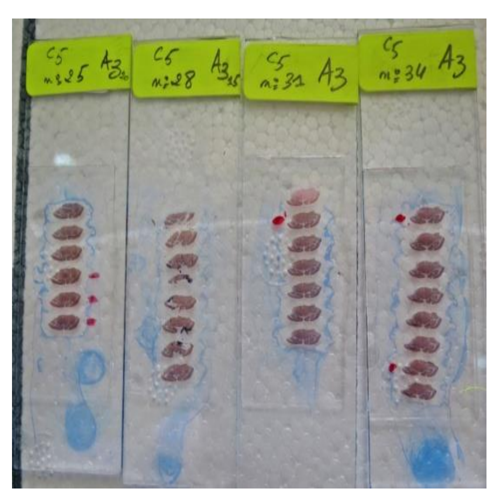
Réalisation des coupes

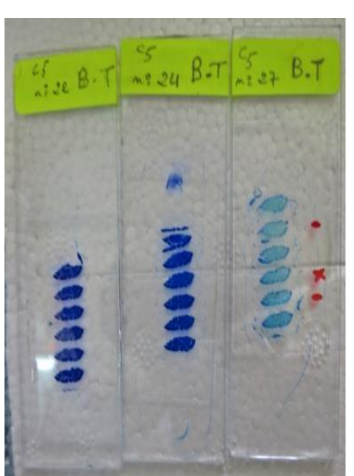
Obtention des rubans De coupes

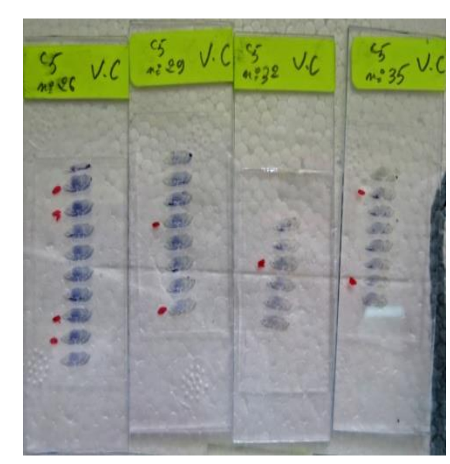
Etalement

Coloration




C5 n°28 A3
C5 n°31 A3
C5 n°34 A3


C5 n°24 B.T
C5 n°27 B.T


C5 n°29 V.C
C5 n°32 V.C
C5 n°35 V.C

Analyse des coupes au M.Ph.

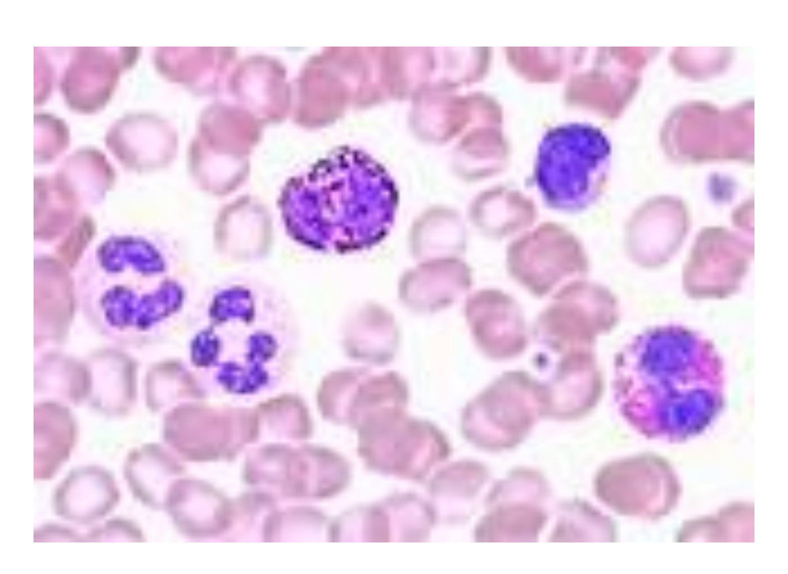


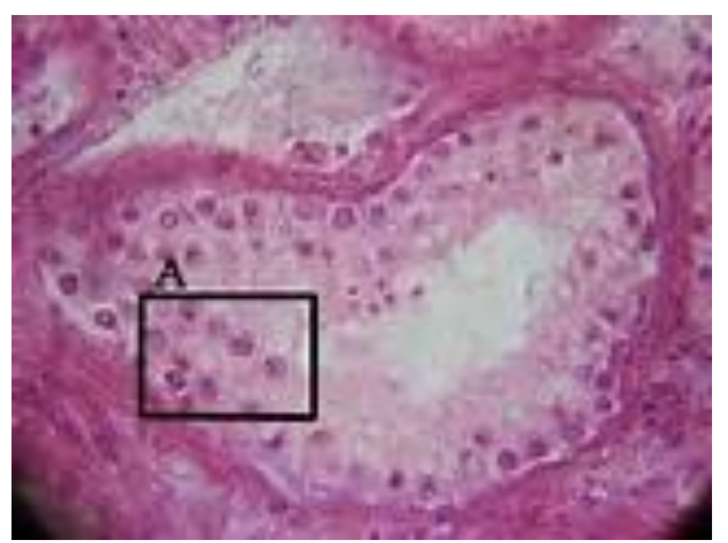
Résumé

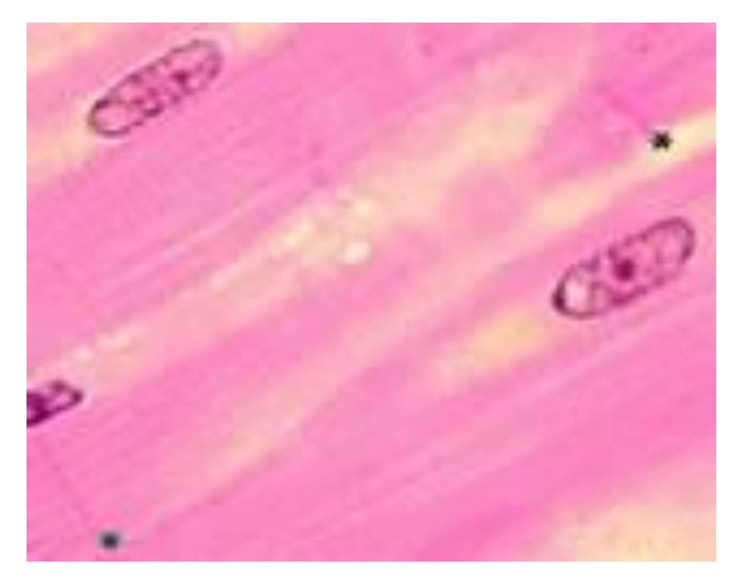
- **Fixer** = figer les structures cellulaires
tel qu'elles étaient à l'état vivant

- **Couper** =Enrober l'échantillon dans un milieu favorable
à la réalisation de coupes régulières et fines

- **Etaler** les coupes sur une lame de verre et les **colorer**
pour augmenter les contrastes naturelles faibles







Etude structurale des tissus et des cellules



Le microscope photonique à fond clair M. Ph. / M.O.

- Description
- Fonctionnement
- Technique histologique

Le microscope photonique à fluorescence

- Principe de fonctionnement
- Technique de détection et localisation des composés cellulaires

Le microscope électronique à transmission MET

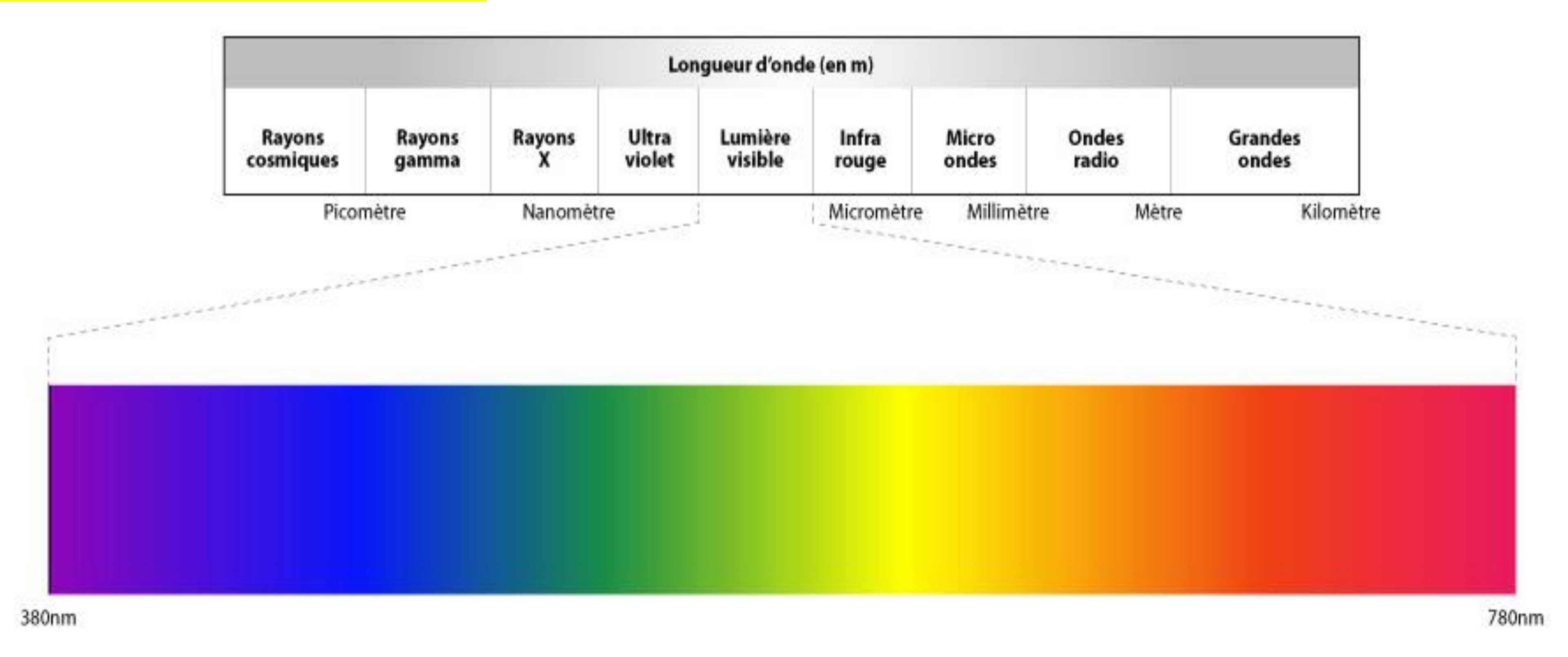
- Fonctionnement
- Technique des coupes minces et coloration positive
- Technique d'autoradiographie

Le microscope à fluorescence: un microscope photonique qui détecte une lumière fluorescente



Principe de fonctionnement du microscope à fluorescence

Il faut savoir que



Décomposition du spectre de la lumière visible

Formation de l'image fluorescente

Oculaire

3 Second filtre d'arrêt : coupe les signaux fluorescents non désirés, laissant passer l'émission verte spécifique de la fluorescéine entre 520 et 560 nm

SOURCE LUMINEUSE

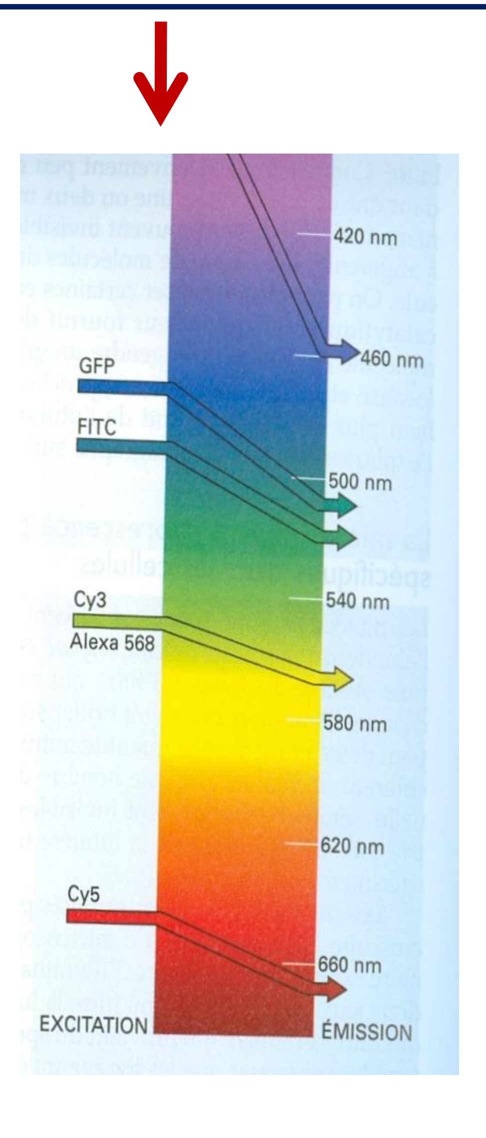
2 Miroir semi-réfléchissant : réfléch la lumière bleue de longueur d'onde comprise entre 450 et 490 nm

1 Premier filtre d'arrêt : laisse passer uniquement la lumière bleue de longueur d'onde comprise entre 450 et 490 nm

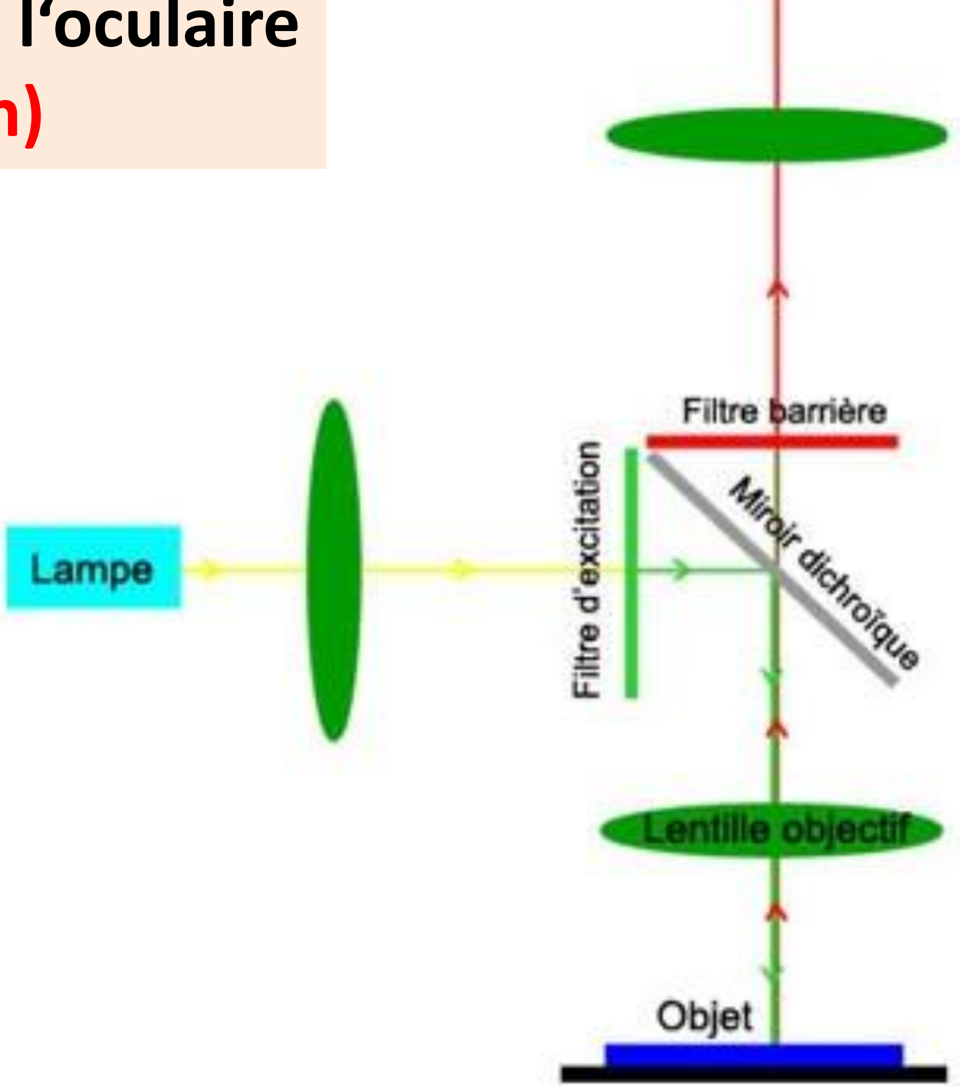
Lentille de l'objectif

Objet

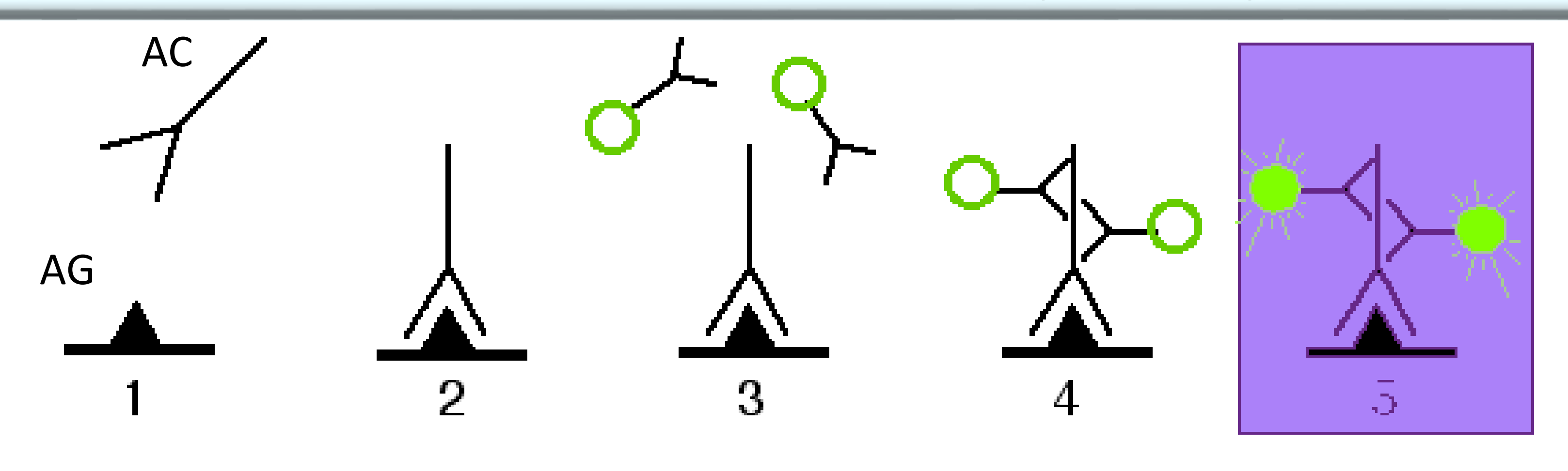
Interactions: lumière -fluorochromes



Trajet de la lumière qui éclaire l'échantillon (lumière d'excitation) et de la lumière transmise à l'oculaire (lumière d'émission)



Pour induire la fluorescence on associe le fluorochrome (marqueur)à une molécule (AC)qui peut reconnaître la molécule recherchée (AG) en utilisant le principe de la réaction immunitaire (AG-AC)

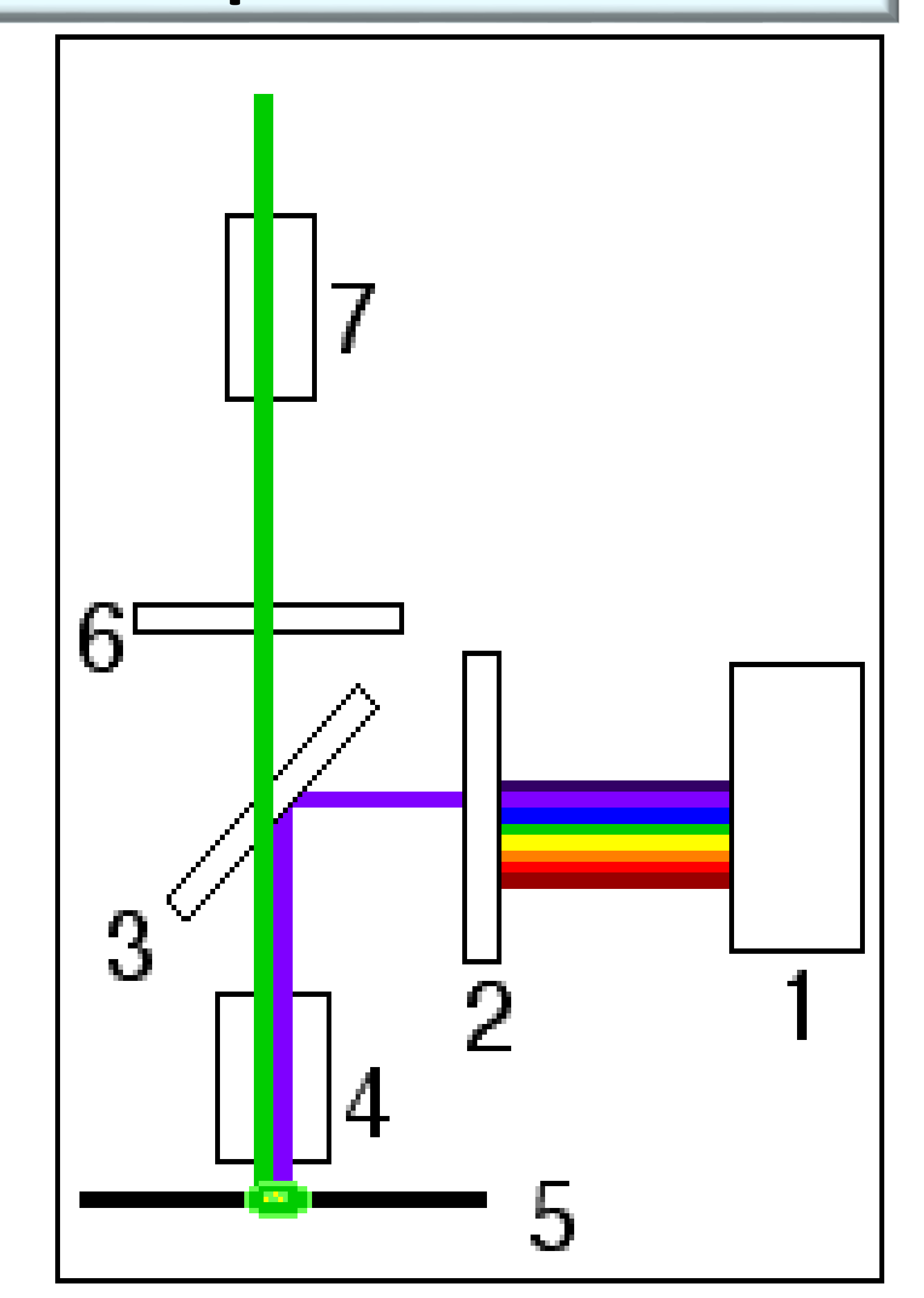


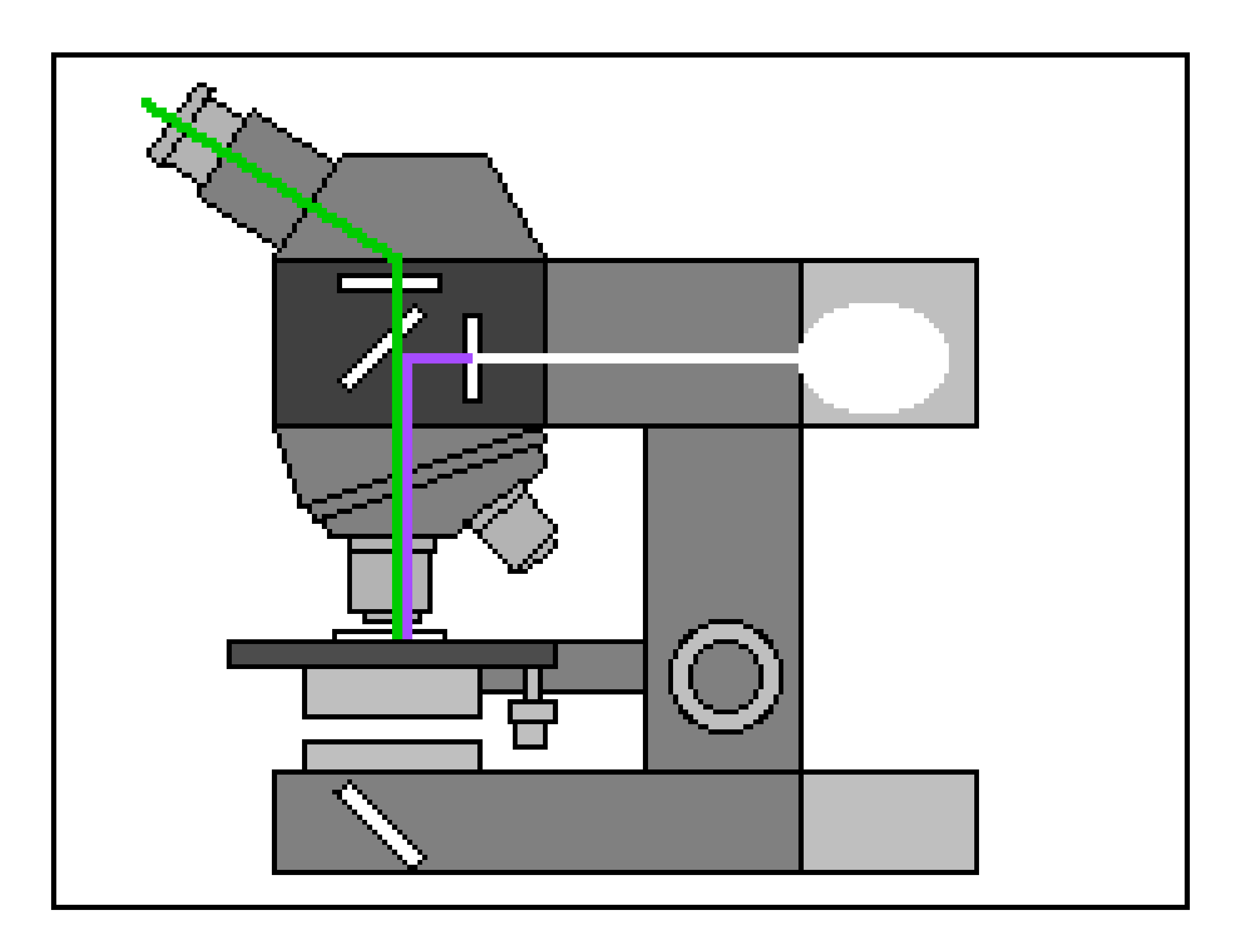
Fluorochromes	rhodamine	fluorescéine	FITC	orange d'acridine	DAPI
Couleur d'excitation	vert	bleu	bleu	bleu	UV

Les marqueurs fluorescents les plus courants et leurs lumières d'excitation

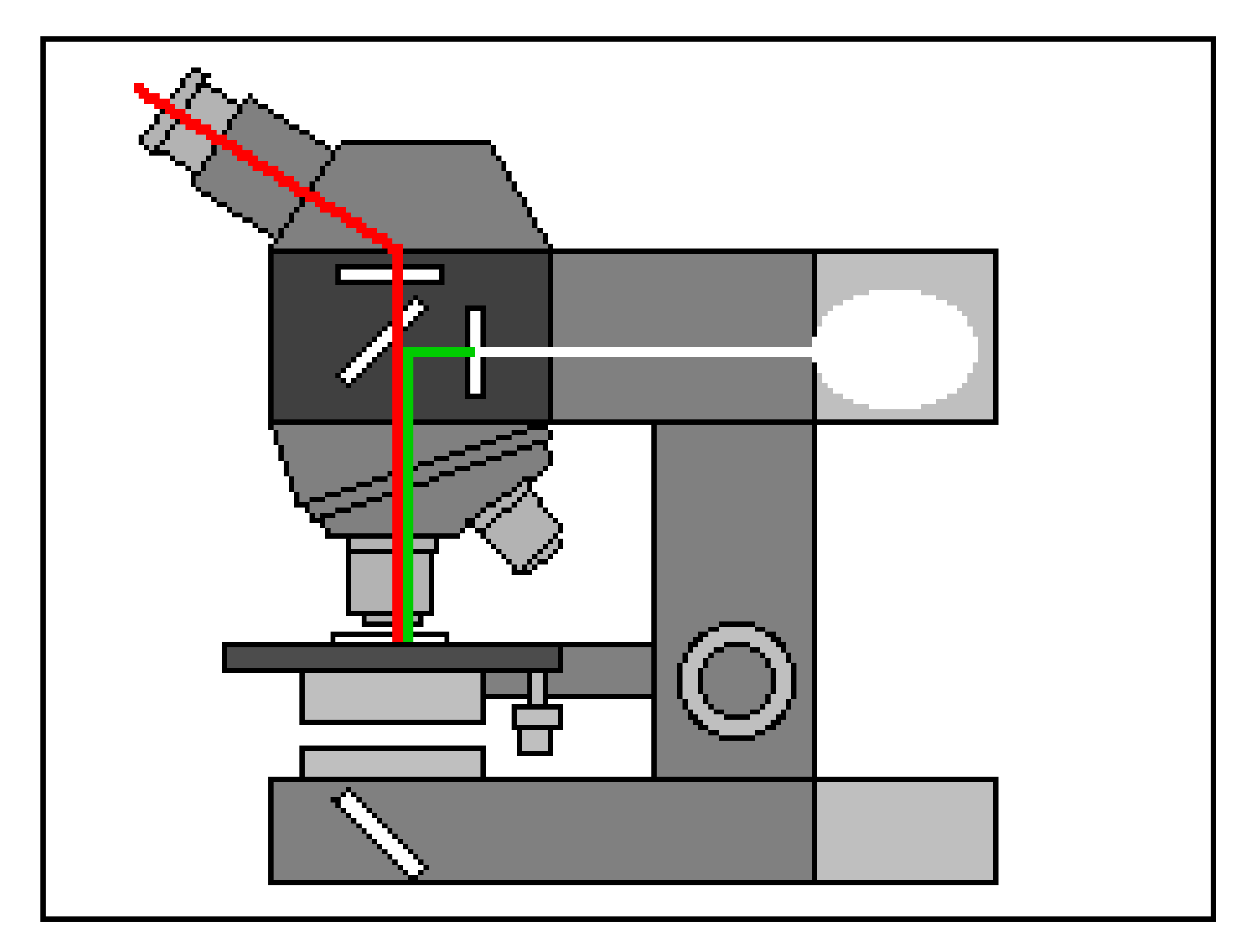
Optique simplifiée du microscope à fluorescence

1-lampe à arc
2-filtre d'excitation
3-miroir dichroïque
4-objectif
5-préparation
6-filtre d'émission
7-oculaire





Observation en utilisant le jeu de filtres spécifique de la fluorescéine.



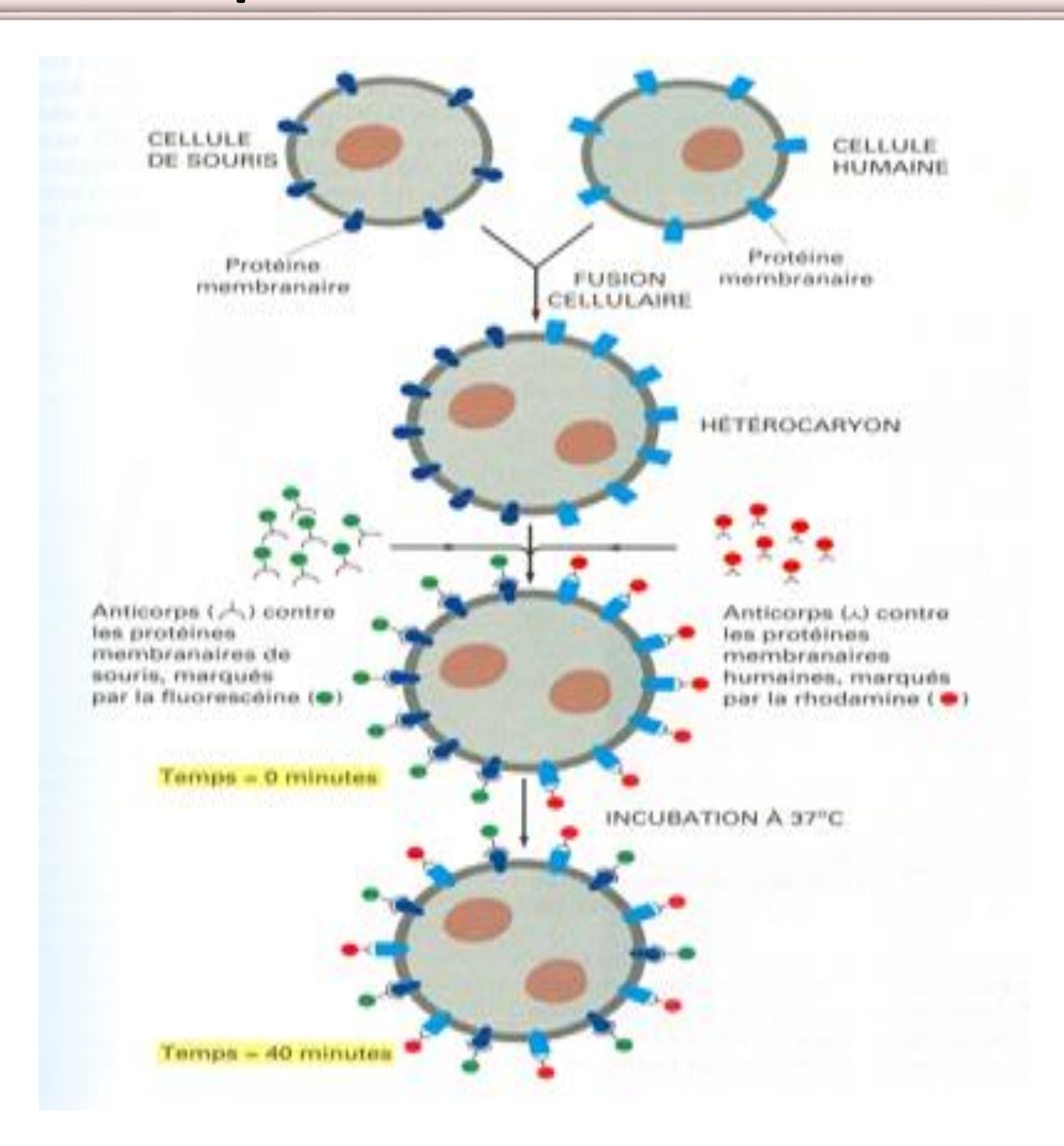
Observation en utilisant le jeu de filtres spécifique de la rhodamine.

Applications techniques De l'immunofluorescence

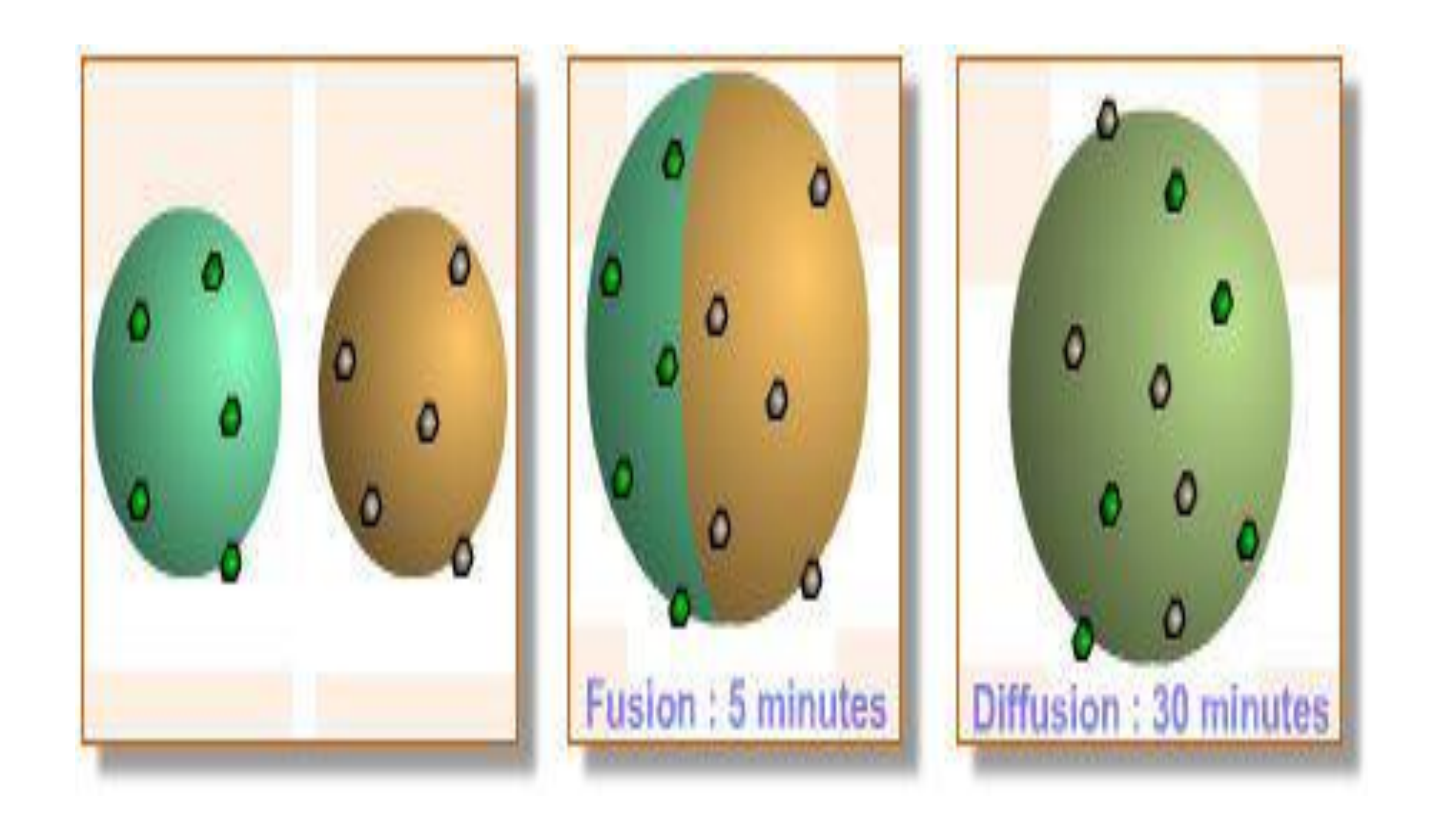
Mise en évidence
de la fluidité des protéines
membranaires

Détection, localisation
et quantification de
protéines cellulaires
(hormones, récepteurs,
Cytosquelette….)

Mise en évidence de la fluidité des protéines membranaires



La technique d'immunofluorescence sur hétérocaryon (expérience de Frye &Edidin 1970) p: 35

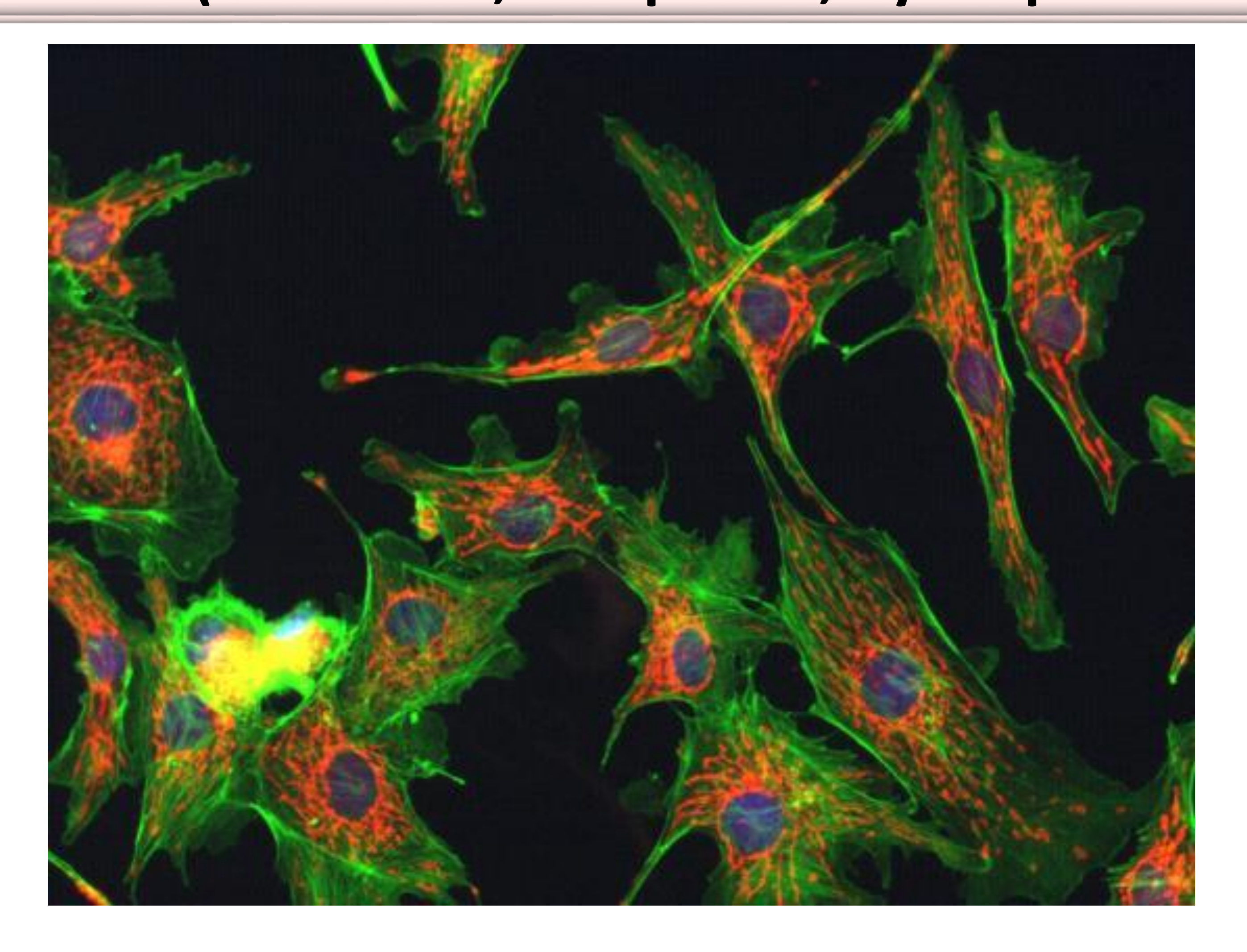


Applications techniques De l'immunofluorescence

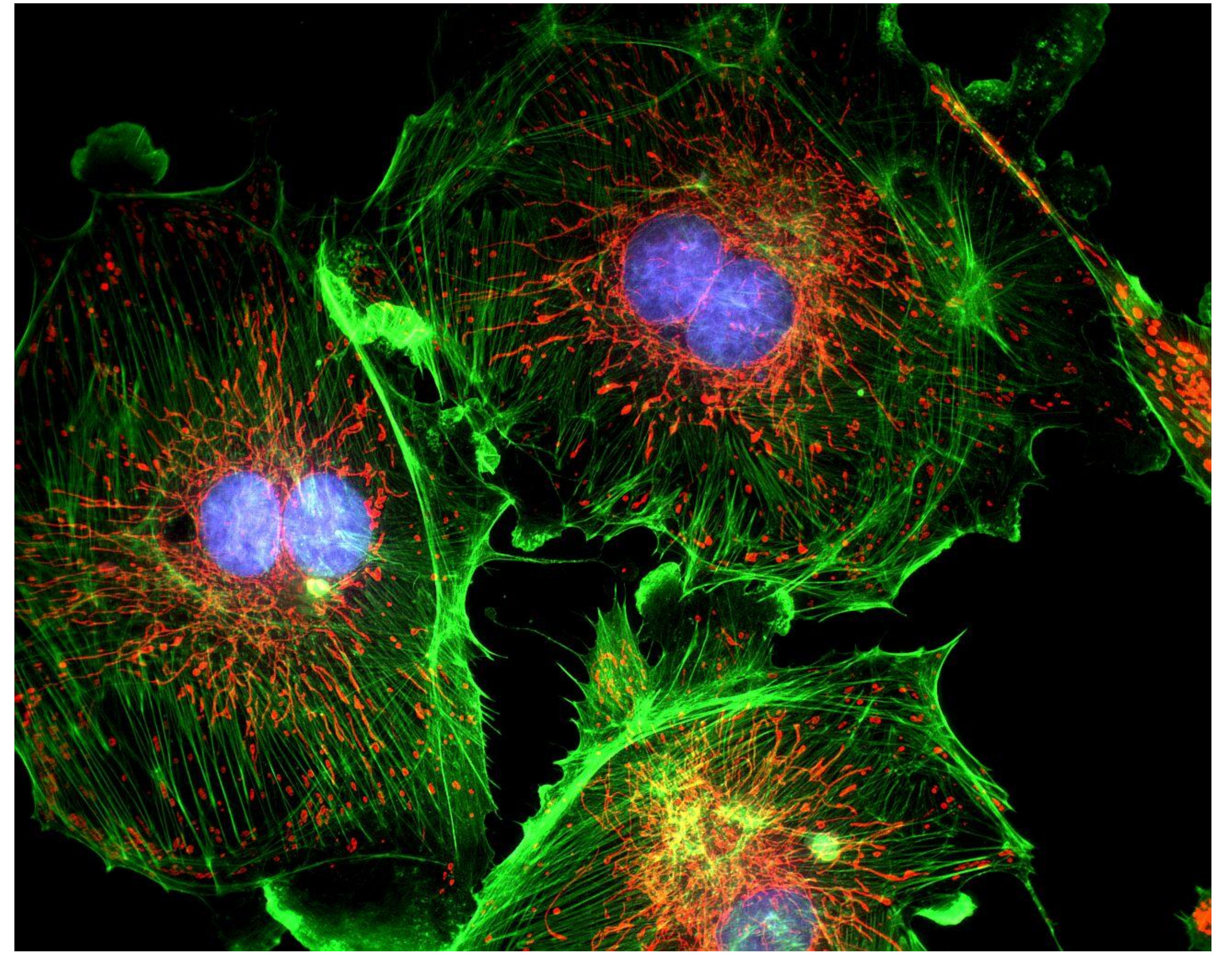
Mise en évidence
de la fluidité des protéines
membranaires

Détection, localisation
et quantification de
protéines cellulaires
(hormones, récepteurs,
Cytosquelette....)

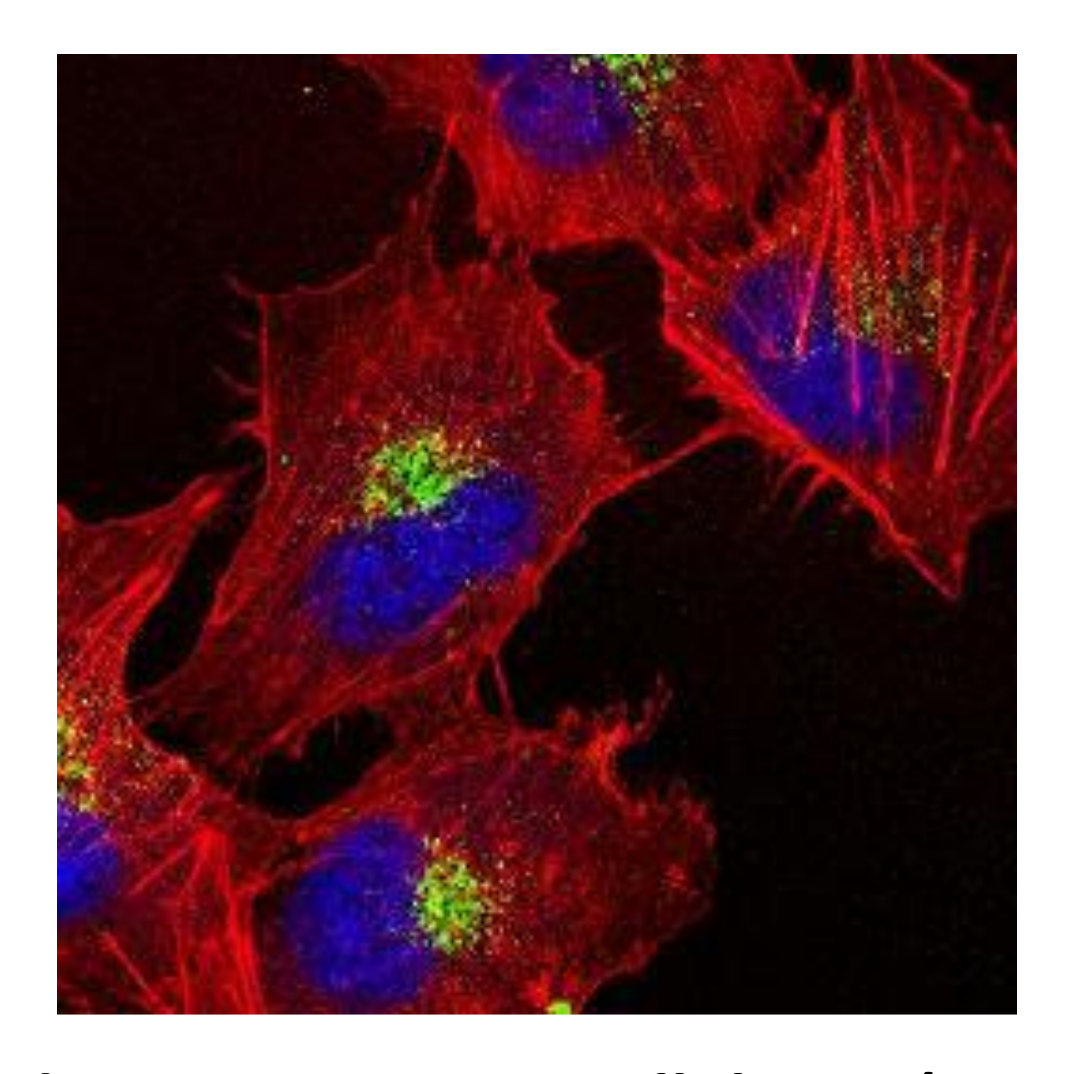
Détection, localisation et quantification de protéines cellulaires (hormones, récepteurs, Cytosquelette….)



Répartition des éléments du cytosquelette dans les neurones



Répartition des éléments du cytosquelette dans les cellules en division



Marquage de structures intracellulaires (noyau en bleu et filaments d'actine en rouge) et suivi de l'internalisation d'une protéine (la transferrine en vert)